

Nucleäre Nucleosidphosphathydrolyse während der Cancerisierung.

Das Verhalten der GTPase in den Zellkernen
der Rattenleber während der Cancerisierung
durch Diäthylnitrosamin (DÄNA).

vorgelegt von
Sigrid Urban

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Eder

Nucleäre Nucleosidphosphathydrolyse während der Cancerisierung.

Das Verhalten der GTPase in den Zellkernen
der Rattenleber während der Cancerisierung
durch Diäthylnitrosamin (DÄNA).

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sigrid Urban
aus Mainz

Mainz 1970

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schauer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Büngeler
Dekan: Prof. Dr. E. Kraft
Tag der mündlichen Prüfung: 28.7.1970



Meinen Eltern gewidmet

I. Einleitung.

Schmähl, Preußmann und Hamperl (34) hatten durch Versuche mit geringen Dosen von Diäthylnitrosamin (DÄNA) die krebserzeugende Wirkung dieser aliphatischen N-Nitroso-Verbindung erkannt und bewiesen. Die Substanz ist organotrop und ruft spezifisch in der Leber carcinomatöses Gewebe hervor. Es wurden zahlreiche und mannigfaltige Untersuchungen über die cancerogenbedingten Veränderungen in Cytoplasma und Kern durchgeführt, die sich auf die Gebiete der Morphologie und Biochemie erstrecken. In der vorliegenden Arbeit befassen wir uns speziell mit der Aktivität der Guanosin-5' triphosphatase (GTPase) in Zellkernen der Leber während der Cancerisierung durch DÄNA. Die Messungen begannen am 50. Tag und wurden bis zum Auftreten des vollausgebildeten Carcinoms, also bis zum 150. Tag (15) durchgeführt. Es sollten die Veränderungen der GTPase-Aktivität in den Leberzellkernen während der präcancerösen Phasen erfaßt werden. Zu diesem Zweck wurde nach Entnahme der Leber aus den mit DÄNA behandelten Tieren und nach Isolierung der Kerne nach einer modifizierten Methode von Maggio (27) die Enzymaktivität in einem optischen Test gemessen.

II. Methode

a) Zellkernisolierung:

Die Versuche wurden mit insgesamt 140 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. 100 Tiere erhielten täglich 4 mg/kg KG Diäthylnitrosamin im Trinkwasser (auf 25 l Brunnenwasser 0,825 ml DÄNA); die restlichen 40 dienten für die Kontrolluntersuchungen. Die Versuche begannen am 50. Tag der DÄNA-Gabe. Es wurden im Abstand von 10 Tagen bis zum 150. Tag jeweils 9 behandelte Tiere getötet. Die Tiere wurden durch Äther betäubt, darauf dekapitiert und entblutet. Die Leber wurde entnommen und sogleich in 0,88 m Saccharoselösung von 4° C gegeben. Danach wurde die Leber von anhaftendem Bindegewebe und sichtbaren Gefäßen gereinigt, die Leberlappen mit der Schere zerkleinert und in eisgekühlter 0,88 m Saccharoselösung gewaschen. Die Leberstückchen wurden in ein Sieb gegeben und die Rohrzuckerlösung möglichst gut davon abgetrennt. Sodann wurden die Stückchen durch das Sieb passiert und die Menge gewogen. Pro 1 g Leber wurden 16 ml 0,88 m Saccharoselösung dazugegeben, die im Liter 1,5 mM Ca Cl_2 enthielt. Das Gemenge wurde im Homogenisator bei niedriger Tourenzahl insgesamt durch 6 Stöße mit dem Teflonstößel homogenisiert, wobei zwischendurch immer eine Kühlung durchgeführt wurde, sodaß eine konstante Temperatur von 4° C einge-

halten wurde. Das Homogenat wurde durch 4 Schichten Musselin filtriert, um so noch vorhandenes Bindegewebe zu entfernen. Vom Filtrat wurden je 14 ml in ein Zentrifugenglas pipettiert und mit 7 ml einer 2,0 m Saccharoselösung, die im Liter 1,5 mM Ca Cl_2 enthielt, unterschichtet. Die Lösungen wurden sodann 30 Minuten lang in einer Ultrazentrifuge bei 53 000 g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment zeigte sich als flache, blasse Scheibe am Boden des Zentrifugenglases. Darüber befand sich die kaum getrübte 2,0 m Saccharoselösung, dann eine dicke, rotbraune Schicht, die Cytoplasma und teilweise zerstörte Leberzellen enthielt, zuoberst die stark getrübte 0,88 m Saccharoselösung. Diese überstehenden Schichten wurden abgesaugt und die Kappe des Zentrifugenglases, in der die Kerne sedimentiert waren, mit der Schere herausgeschnitten. Die Kerne wurden in einigen ml Aqua bidest. aufgenommen und in der Thoma-Zeiss-Zählkammer (0,100 mm; $1/400$ qmm) ausgezählt. Auf diese Weise kann eine quantitative Beziehung zu den gemessenen Enzymaktivitäten hergestellt werden. Zur Überprüfung der Reinheit der Kerne wurden regelmäßig H.E.-Färbungen von Ausstrichpräparaten und in Stichproben elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt[†].

[†] Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen hat Herr Prof. Miller, München, freundlicherweise übernommen.

b) Messung der GTPase-Aktivität:

Die Messung der GTPase-Aktivität wurde nach einem Reaktionsschema durchgeführt, das Holzer (17) für die ATPase angegeben hat und das in gleicher Weise für die GTPase anzuwenden ist.



Der Umsatz von NADH^- zu NAD^+ ist hierbei die Vergleichsgröße für die Aktivität der GTPase. 1 Mol gebildetes NAD^+ entspricht 1 Mol GDP (3). Die Geschwindigkeit der Reaktion wird bestimmt durch den Umsatz von GTP zu GDP; die Reaktionen (2) und (3) laufen sehr schnell ab; GTP wird immer wieder zurückgebildet, sodaß rückwirkend kein hemmender Einfluß auf Reaktion (1) auftreten kann. Das Testsystem reagiert in seiner Kinetik also unabhängig von der GTP-Hydrolyse, zumal auch die Reagentien (Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, NADH^- , Lactatdehydrogenase) im Überschuß zugesetzt werden, sodaß dadurch der Reaktionsablauf nicht beeinträchtigt werden kann. Die Proportionalität der GTPase-Aktivität und des NADH^- -Umsatzes ist auf diese Weise gegeben. Die experimentelle Durchführung geschieht mittels eines optischen Testes, der von Fischer, Siebert und Adloff (11) für die Messung der ATPase angegeben wird und der auch für die Messung der GTPase tauglich ist.

Fa.Boehringer und Söhne hat diese Testvorschrift modifiziert; sie liegt unseren Versuchsanordnungen zugrunde.

c) Lösungen:

- 1) Triäthanolamin - Puffer (0,1 m, pH 6,6 - 8,4)
Diäthanolamin - Puffer (0,1 m, pH 8,4 - 9,6)
- 2) Guanosin-3'-triphosphat-Lösung (GTP)
10 mg GTP, Na-Salz in 1 ml aqua bidest. lösen
- 3) Mg SO₄-Lösung (0,032 m)
0,79 g Mg SO₄ · 7 H₂O in 100 ml aqua bidest. lösen
- 4) K Cl-Lösung (4m)
28,4 g K Cl in 100 ml aqua bidest. lösen
- 5) Phosphoenolpyruvat-Lösung (PEP)
5 mg PEP, Cyclohexylammonium-Salz in 1 ml aqua bidest. lösen
- 6) NADH-Lösung
10 mg NADH, Na-Salz in 1 ml aqua bidest. lösen
- 7) Pyruvatkinase (PK) 10 mg Protein/ml
- 8) Lactatdehydrogenase (LDH) 5 mg Protein/ml

d) Ausführung:

Meßstrahlung: 366 nm

Testvolumen: 3,13 ml

Schichtdicke: 1 cm

Temperatur: 22°C

Tra-Puffer	(1)	2,25 ml
GTP	(2)	0,20 ml
Mg SO ₄	(3)	0,10 ml

K Cl	(4)	0,10 ml
PEP	(5)	0,10 ml
NADH	(6)	0,10 ml
PK	(7)	0,01 ml
LDH	(8)	0,02 ml

Die Reagentien werden in angegebener Reihenfolge einpipettiert und gemischt. Nach Stillstand der Vorreaktion nach etwa 7 Minuten wird die Hauptreaktion durch Zufügen von 0,25 ml der Kernsuspension in Gang gesetzt. Die Messung wird doppelt ausgeführt und die Extinktion nach 5, 10 und 15 min. abgelesen. Daraus wird der Mittelwert der Extinktionsänderung pro Minute $\Delta E/\text{min.}$ gebildet. Die Ergebnisse werden auf 1 Million Kerne bezogen, um eine vergleichbare Ausgangsbasis zu erhalten.

- 1) Um die Proportionalität der Extinktionswerte und der GTPase-Aktivität zu kontrollieren, wurden dem Testansatz verschiedene Mengen der Suspension mit bekannter Kernzahl zugesetzt (0,125 ml; 0,25 ml; 0,50 ml). Die Messung wurde bis zum Stillstand der Reaktionen durchgeführt. (Abb. 3)
- 2) Die Abhängigkeit der GTPase-Reaktion vom pH-Wert wurde durch 7 verschiedene Puffermischungen in den pH-Bereichen von 6,5-9,4 geprüft. Dabei wurde eine gleichbleibende Menge der Suspension eingesetzt. Die Nahtstelle zwischen Triäthanolaminpuffer und Diäthanolaminpuffer bei pH 8,4 wurde gesondert auf

Identität untersucht. Diese Messungen wurden mit unbehandel-
ten Tieren durchgeführt. (Abb. 4)

- 3) Auf die gleiche Weise wie unter 2) wurden die Versuche mit
den Zellkernen der vorbehandelten Tiere vom 50. bis zum 150.
Tag vorgenommen. (Abb. 5) Die GTPase-Aktivität (mMol) wurde
aus den Extinktionswerten nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta E / \text{min.} \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

wobei:	$\Delta E / \text{min.}$	= abgelesene Extinktion/min.
	V	= Vol. der Küvette in ml.
	ϵ	= Extinktionskoeffizient für NADH bei 366 nm : $3,3 \text{ cm}^2 / \mu \text{ Mol}$
	d	= Schichtdicke 1 cm
	v	= Probevolumen in ml.

III. Befunde

Die Reinheit der Kerne wird aus den beiden elektronenmikros-
kopischen Bildern Abb. 1 und 2 ersichtlich. Die Kernmembran
ist im allgemeinen erhalten, sodaß sich kein Verlust des Nucleo-
plasmas zeigt. Die Struktur der Kerne ist durch die Isolierung
nicht beeinträchtigt worden.

Zu 1) ist zu bemerken, daß eine Proportionalität zwischen den Extinktionswerten und der eingesetzten Kernmenge, bzw. GTPase-Aktivität vor allem in den ersten 30 min. gegeben ist. (Abb. 3) Bis zu diesem Zeitpunkt verlaufen die Kurven linear. Die Abweichungen im Anschluß daran sind so zu erklären, daß bei höher eingesetzter Enzymmenge die Reaktion sich dem Stillstand schneller nähert und entsprechend NADH gesteigert verbraucht wird. Die Zeit, nach der der Reaktionsstillstand auftritt, erweist sich als umgekehrt proportional zur eingesetzten Menge der Kernsuspension, d. h. zur GTPase-Menge und bestätigt damit die Ergebnisse.

Zu 2): für diesen Nachweis wurden 12 Tiere verwendet. In allen Zellkernsuspensionen war GTPase nachweisbar, die sich pH-abhängig verhielt. Die Aktivität des Enzyms stieg um durchschnittlich 25% zwischen pH 6,5 und 7,5 an. Bis zum pH 8,2 hielten sich die Aktivitäten in etwa auf einem Plateau, um danach bis zum pH 9,5 um ungefähr dieselbe Menge wieder abzusinken. (Abb. 4) Bei pH 10,1 war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar. Die beiden Puffer Tri- und Diäthanolamin lösten sich bei pH 8,2 ohne nennenswerte Differenzen ab.

Zu 3): Auch bei den mit DÄNA vorbehandelten Tieren zeigte sich die gleiche pH-Abhängigkeit der GTPase-Aktivität wie bei den unbehandelten Tieren, sowohl bezüglich des An- und Abstiegs als auch des Plateaus. (Abb. 5) Die vor-, wie die unbehandelten Tiere

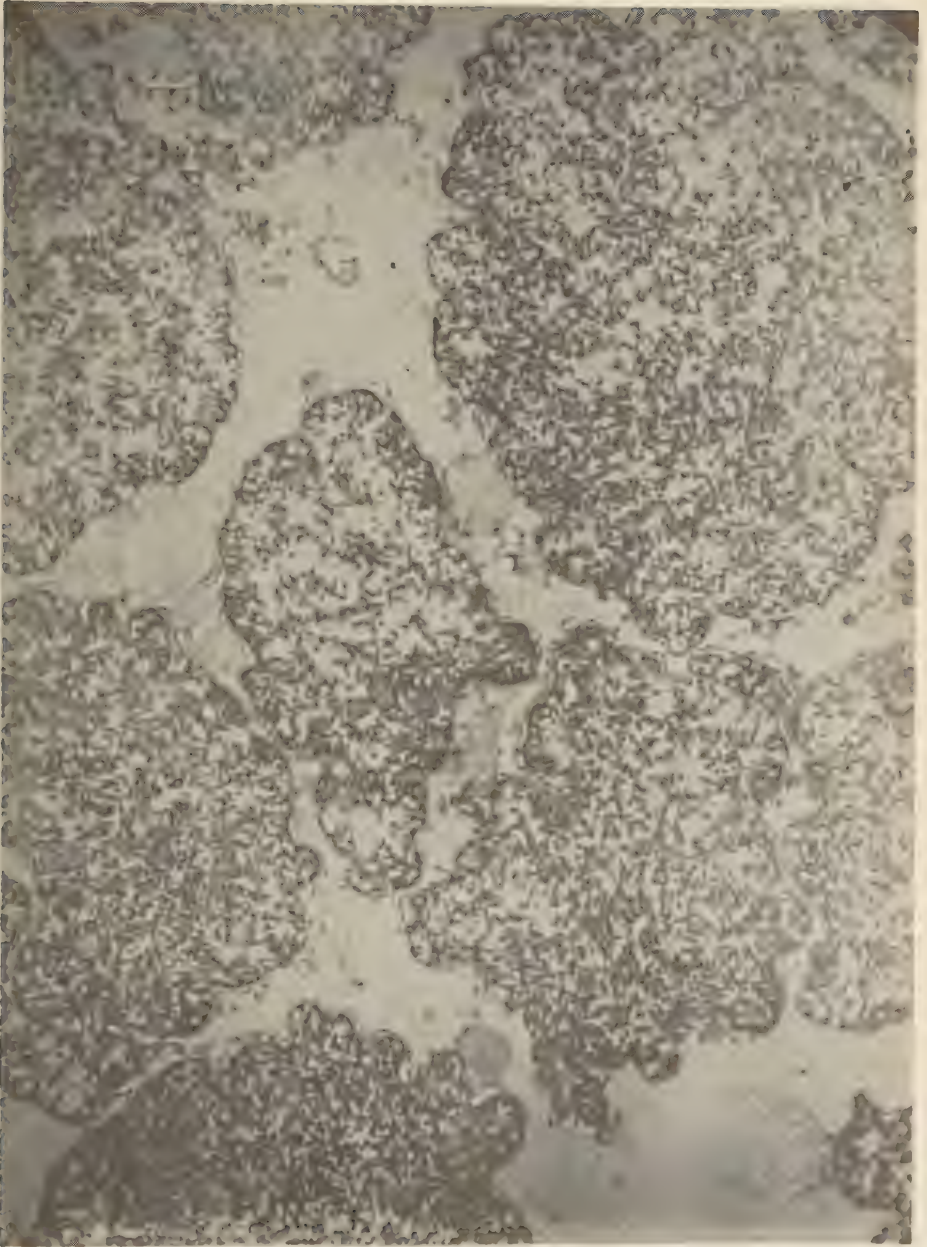


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Zellkernen der Rattenleber. (Isolierung nach Maggio)

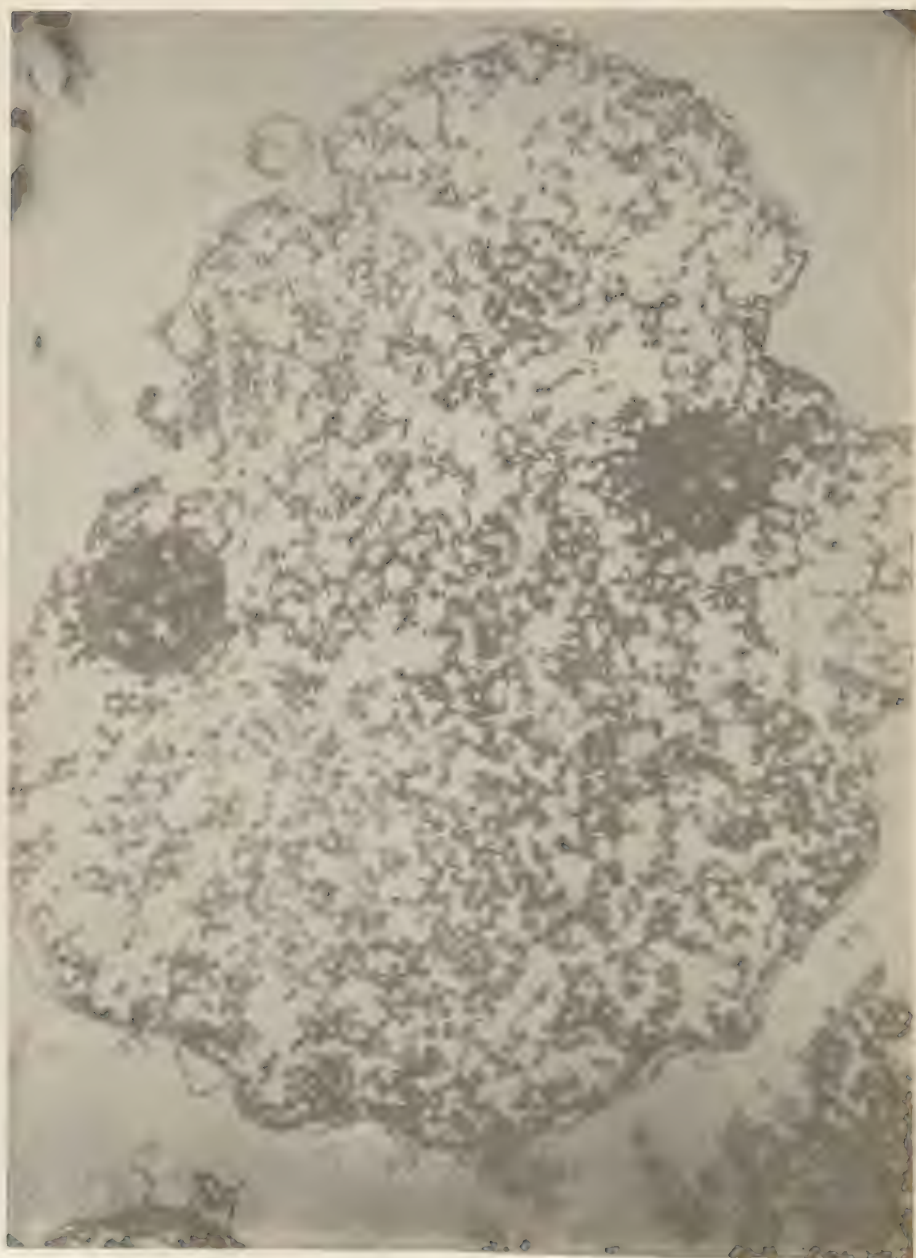


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellkernes der Rattenleber (Isolierung nach Maggio).

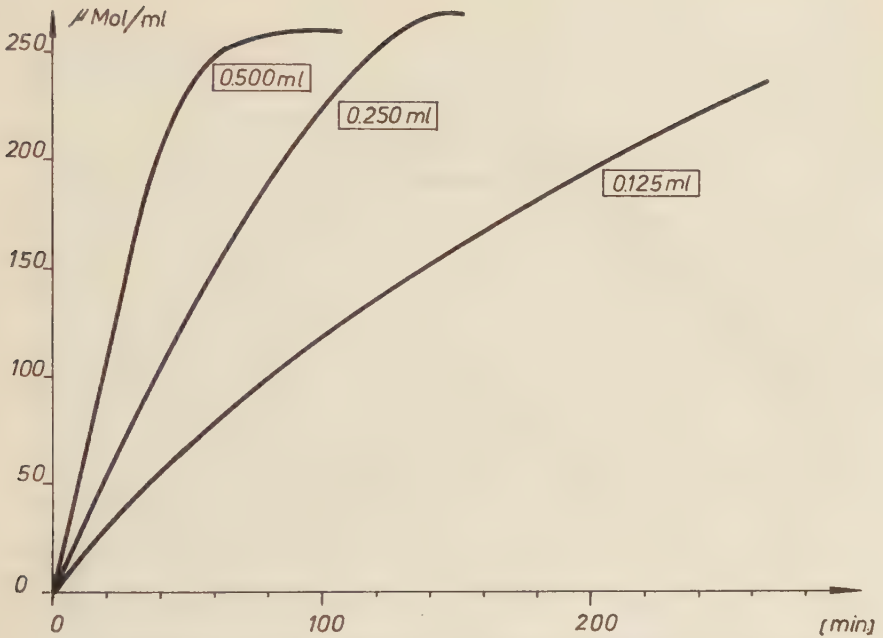


Abb.3

Verhalten des Umsatzes bei Änderung der zugesetzten Kernmenge, d. h. Enzymmenge. Messung bei pH 8,2.

schwanken in ihren Meßwerten unter sich nur wenig, so daß die Daten innerhalb der normalen Streubreite liegen. Die Enzymaktivität nimmt bei den DÄNA-Tieren vom 50. bis zum 150. Tag in allmählich absteigender Kurve ab. Gleichartig dazu, meist mit etwas tieferen Meßwerten, verläuft die Kurve der Kontrolltiere. (Abb. 6) Es nimmt die GTPase-Aktivität also sowohl bei den vor-

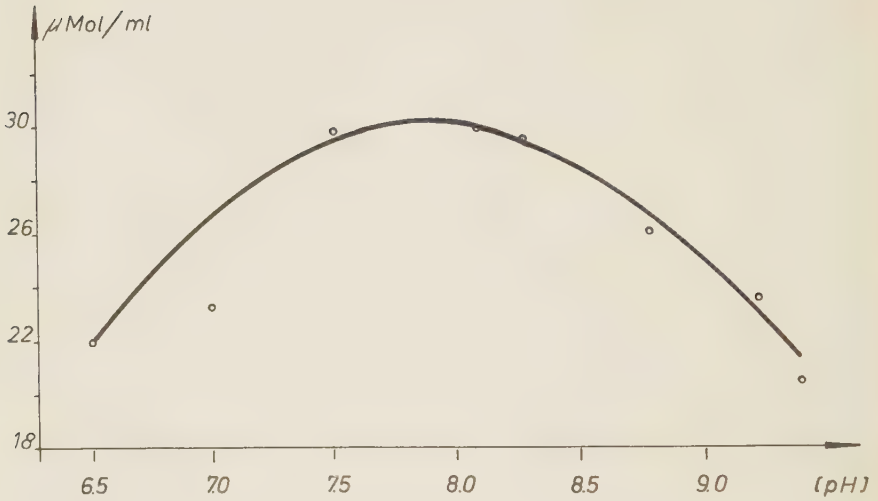


Abb. 4

Verhalten der GTPase-Aktivität der unbehandelten Tiere bei Änderung des pH-Wertes.

behandelten, wie auch bei den unbehandelten Tieren ab, und zwar von 38 μMol auf 18 μMol bei den Kontrolltieren und von 38 μMol auf 24 μMol bei den DÄNA-Tieren.

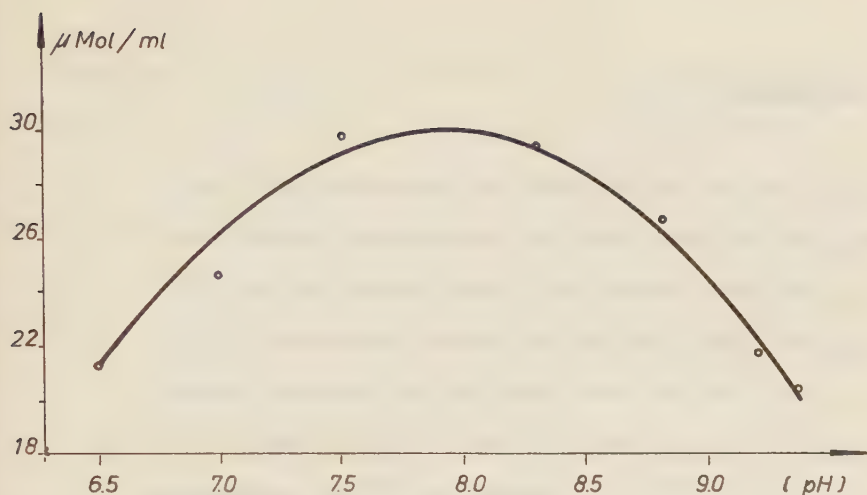


Abb. 5

Verhalten der GTPase-Aktivität bei DÄNA Tieren
in Abhängigkeit vom pH-Wert (100. Tag der DÄNA-Gabe.)

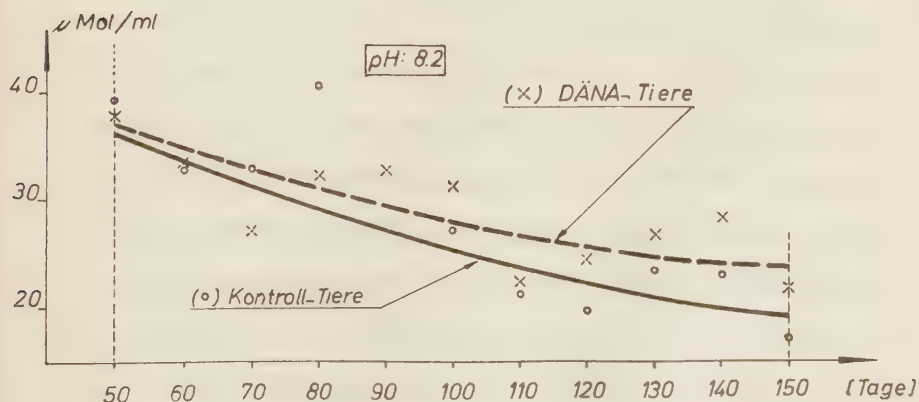


Abb. 6

Verhalten der GTPase-Aktivität bei Kontroll- u. DÄNA-Tieren
vom 50. bis zum 150. Tag. Messung bei pH: 8,2.

IV. Diskussion.

Zunächst sei kurz auf das Problem der Zellkernisolierung im wäßrigen Milieu eingegangen. Von verschiedenen Autoren waren dazu modifizierte Verfahren beschrieben worden, die mehr oder weniger zufriedenstellend in ihren Ergebnissen waren. (5, 6, 9, 13, 31) Für unsere Versuche der Gewinnung von Zellkernen aus dem Lebergewebe von Ratten hatte sich die Methode von Maggio (27) als geeignet erwiesen. In Übereinstimmung mit den Befunden von Maggio zeigen sich auch unsere Kerne im allgemeinen durch die Isolierung wenig beeinträchtigt. Eine geringe Menge anhaftenden Cytoplasmas ist nach Maggio ein obligatorischer und nicht reduzierbarer Bestandteil, da ja auch die Kernmembran ein Teil des endoplasmatischen Reticulums ist.

Der Wirkungsmechanismus der Dialkylnitrosamine ist von Druckrey (10) dargestellt und gilt in gleicher Weise für Diäthyl- und Dimethylnitrosamin (21, 22, 24, 25, 26, 29). Demnach wird durch ein mikrosomales N-deäthylendes Enzym der Leber Diäthylnitrosamin zu Diazohydroxyd dealkyliert und daraus durch Wasserabspaltung Diazoalkan gebildet (10, 18). Letzteres ist durch Zerfall und Bildung eines stark alkylierend wirkenden Carbenium-Ions cancerogen. Die Alkylierung erfolgt an Proteinen und Nukleinsäuren (28), wobei die Position 7 des Guanin bevorzugt zu sein scheint. (3, 19, 22)

In der RNS der Leber tritt 7-Äthylguanin auf und, wie aufgewiesen wurde, ebenso in der DNS. Eine Änderung der Moleküle der DNS aber dürfte verantwortlich sein für die Entstehung von Mutationen und für die Krebsentwicklung (2, 22, 23). Vor allem ist die Replikation der DNS, die sich aus dem Watson-Crick-Modell ableiten läßt, dadurch gestört, daß das alkylierte Guanin bevorzugt Verbindungen sowohl innerhalb eines DNS-Stranges als auch zwischen beiden Strängen herstellt (4, 19, 20). Die Synthese zellspezifischer Proteine ist in ihrem regelrechten Ablauf nicht mehr möglich und so wird der physiologische Rückkoppelungsmechanismus außer Kraft gesetzt, der die Neubildung von DNS durch die Anwesenheit dieser spezifischen Eiweißkörper reguliert. Die DNS-Stränge verdoppeln sich immer rascher. Mit dieser entkoppelten DNS- und RNS-Synthese im Kern (7, 16, 30) geht als Ausdruck eines erhöhten Funktionsstoffwechsels eine Vergrößerung und Vermehrung der Nucleolen einher (1, 15). Vom Nucleolus wird vermehrt RNS gebildet, die im Cytoplasma unter Mitwirkung der Ribosomen zur Synthese von Proteinen verwendet wird. Durch vermehrte Zellteilungen führt der Prozeß zu carcinomatösem Wachstum (28). Auch in der nicht gestörten Zelle läßt sich die Beziehung zwischen Nucleolus und RNS-Stoffwechsel nachweisen. Es zeigen sich wesentlich höhere Aktivitäten bestimmter, am RNS-Stoffwechsel beteiligter Enzyme im Nucleolus (35, 36). Andere für diese Prozesse spezifische

Enzyme sind fast nur im Nucleolus lokalisiert. Als ein solches Enzym wird auch die GTPase beschrieben (37).

Die GTPase ist im Nucleolus vorwiegend an fibrilläre und granuläre Bestandteile gebunden. In geringem Maß findet sich das Enzym auch im Nucleoplasma. Im Cytoplasma sind nur Spuren vorhanden, in den Mitochondrien tritt es überhaupt nicht auf.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß für die Höhe der Aktivität der GTPase die geringen Teile des Cytoplasmas, die den Kernen nach der Isolierung anhaften, wie oben beschrieben wurde, keine Rolle spielen dürften. Auch haben unsere Beobachtungen an einigen Kernsuspensionen ergeben, daß die Enzymaktivität nicht mit dem Gehalt an cytoplasmatischen Bestandteilen ansteigt. Nur bei sehr großem Gehalt an Cytoplasma, der aber dann schon außerhalb der Bedingungen für unsere Untersuchungen liegt, zeigt sich ein leichter Anstieg der GTPase-Aktivität. Dieser ist durch die Spuren der GTPase im Cytoplasma erklärbar.

Wir haben festgestellt, daß bei unseren Versuchen die GTPase-Aktivität der vorbehandelten Tiere meist etwas höher lag als bei den Kontrolltieren. Zur Erklärung dieser Tatsache wäre die Vermehrung des Nucleolarvolumens und der erhöhte RNS-Umsatz des Nucleolus zu berücksichtigen (1, 14). Die Steigerung des Zellstoffwechsels, besonders des RNS-Protein-Stoffwechsels des Kernes, führt zu einer Erhöhung

der Enzymaktivität, wie dies auch schon für Enzymaktivitäten an den Nucleolen von Mastocytomzellen nachgewiesen wurde (32). Diese Erhöhung bedingt eine vermehrte Nucleosid-5'-triphosphat-hydrolyse im Nucleolus, dem auf diese Weise wieder Nucleosid-5'-diphosphate für die RNS-Synthese zur Verfügung stehen. Dadurch daß die Enzyme des Nucleolus in ihrer Aktivität während der Cancerisierung sehr lange erhalten bleiben (33), im Gegensatz zu den cytoplasmatischen, die früh beeinträchtigt werden und somit eine Entgleisung des Zellstoffwechsels zulassen (12), kann die Proteinsynthese weiterhin erfolgen. Die sowohl bei DÄNA- als auch bei Kontrolltieren im Laufe der 150 Tage kontinuierlich abnehmende Enzymaktivität könnte durch das zunehmende Alter der Tiere erklärbar sein. Dontenwill und Reckzeh (8) haben in einem anders gearteten Versuch derartige Einflüsse wahrscheinlich gemacht.

V. Zusammenfassung.

1. Sprague-Dawley-Ratten erhielten 150 Tage lang 4 mg/kg KG Diäthylnitrosamin (DÄNA) im Trinkwasser verabreicht, um eine Cancerisierung zu erreichen.
2. Die Tiere wurden vom 50. Tag an in 10-tägigen Abständen getötet und die Leber entnommen. Die Zellkerne der Leber wurden nach einem Verfahren im wäßrigen Medium (Saccharoselösung) isoliert.

3. Mittels eines optischen Testes wurde die Aktivität der GTPase festgestellt.
4. Die Befunde zeigen eine gleichmäßige Abnahme der Enzymaktivität im Zeitraum vom 50. bis zum 150. Tag und zwar sowohl bei DÄNA- als auch bei den Kontrolltieren. Die Enzymaktivität bei den DÄNA-Tieren liegt etwas höher.
5. Die Befunde werden anhand der Literatur diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis.

- 1) Bargmann W.

Histologie und mikroskop. Anatomie des Menschen.

Stuttgart 1964. S.29

- 2) Biesele J.J.

Some morphological effects of alkylating agents.

Exp.Cell.Res., Suppl. 9, 525-534, (1963).

- 3) Brookes P., Lawley P.D.

The Reaction of Mono- and Di-functional Alkylating Agents
with Nucleic Acids.

Biochem. J. 80, 496-503, (1961).

- 4) Brookes P., Lawley P.D.

Evidence for the action of alkylating agents on deoxyribo-
nucleic acid.

Exp.Cell.Res., Suppl. 9, 521-524 (1963).

- 5) Busch H., Starbuck W.C., Davis J.R.

A Method for Isolation of Nuclei from Cells of the Walker
256 Carcinosa sarcoma.

Cancer Res., 19, 684-687 (1959).

- 6) Chauveau, J., Moulé J., Rouiller Ch.

Isolation of pure and unaltered livers nuclei,
morphology and biochemical composition.

Exp.Cell.Res. 11, 317-321 (1956).

- 7) Côté J., Oehlert W., Büchner F.

Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese
während der experimentellen Kanzerisierung der
Leberparenchymzelle der Ratte durch Diäthylnitrosamin.
Beitr. path. Anat. 127, 450-473 (1962).

- 8) Dontenwill W., Reckzeh G.

Bedeutung von Umwelt- und Wirtsfaktoren für die
Tumorinduktionszeit.
Z.f. Krebsforschung 71, 215-224 (1968).

- 9) Dounce A.L.

The isolation of nuclei from tumor cells.
Exp. Cell. Res., Suppl. 9, 126-143 (1963).

- 10) Druckrey H.

Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung von
Nitrosaminen.
Erste Konferenz über N-Nitrosoverbindungen und
Lactone, September 1963.
(Wissenschaftliche Forschungsstelle im Verband der
Cigarettenindustrie).

- 11) Fischer F., Siebert G., Adloff E.

Charakterisierung von 2 Adenosintriphosphatasen
in Schweinenieren-Zellkernen.
Biochem. Zeitschrift 332, 131-150 (1959).

- 12) Gössner W., Friedrich-Freska H.

Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.

Z. Naturforschung 19b, 862-863 (1964).

- 13) Griggs H. M., Dijkstra J.

The Isolation of Nuclei from Rat Liver during Aminoazo Dye Carcinogenesis.

Brit. J. Cancer 21, 198-204 (1967).

- 14) Grundmann E., Fechner W.

RNS-Gehalt und Volumen der Nucleolen in der Rattenleber während der experimentellen Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin.

Z. Krebsforschung 67, 80-92 (1965).

- 15) Grundmann E., Sieburg H.

Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild.

Beitr. pathol. Anat. 126, 1, 57-90 (1962).

- 16) Hobik H. P., Grundmann E.

Quantitative Veränderungen der DNS und RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin

Beitr. path. Anat. 127, 25-48 (1962).

- 17) Holzer H., Haan J., Schneider S.

Zum Mechanismus des anaeroben Glucose- und Fructose-
Abbaues.

Biochem. Zeitschrift 326, 451-463 (1963).

- 18) Kriek E. und Emmelot P.

Alkylation and Breakdown of Nucleic Acid by
Diazoalkanes.

Erste Konferenz über N-Nitrosoverbindungen und
Lactone. September 1963

- 19) Lawley P.D., Brookes P.

The action of alkylating agents on deoxyribonucleic
acid in relation to biological effects of the alkylating
agents.

Exp. Cell Res., Suppl. 9, 512-520 (1963).

- 20) Lawley P.D., Brookes P.

Molecular mechanism of the cytotoxic action of
difunctional alkylating agents and the resistance
to this action.

Nature 206, 480-483 (1965).

- 21) Magee P.N.

Mechanism of Biological Action of Dimethylnitros-
amine.

Erste Konferenz über N-Nitrosoverbindungen und
Lactone. September 1963.

- 22) Magee P.N., Farber E.

Toxic Liver Injury and Carcinogenesis: Methylation of
Rat-Liver Nucleic Acids by Dimethylnitrosamine.
Biochem.J. 83, 114-124 (1962).

- 23) Magee P.N., Hultin T.

Toxic Liver Injury and Carcinogenesis: Methylation of
Proteins of Rat-Liver Slices by Dimethylnitrosamin.
Biochem.J. 83, 106-113 (1962).

- 24) Magee P.N., Lee K.J.

Cellular Injury and Carcinogenesis: Alkylation of Ribo-
nucleic Acid of Rat Liver by Diethylnitrosamine in vivo.
Biochem.J. 91, 35-42 (1964).

- 25) Magee P.N., Schoental R.

Carcinogenesis by Nitroso Compounds
Brit. Med. Bulletin 1964 Vol.20, No.2, 102-106.

- 26) Magee P.N., Vandekar M.

Toxic Liver Injury
The Metabolism of Dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem.J. 70, 600 (1958).

- 27) Maggio R., Siekevitz Ph., Palade G.E.

Studies on Isolated Nuclei
I., Isolation and chemical characterisation of a nuclear
Fraction from guinea pig Liver.
J. Cell Biol. 18, 267 (1963).

- 28) Mölbert E., Hill K., Büchner F.

Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch
Diäthylnitrosamin im elektronenmikroskopischen
Bild.

Beitr. Path. Anat. 126, 218-242 (1962).

- 29) Mohr U.

Die Cancerogenese durch Diäthylnitrosamin beim
Goldhamster. Untersuchungen zur diaplazentaren
Wirkung.

- 30) Oehlert W., Hartje J.

Die Veränderungen des Eiweiß-Ribonucleinsäure-
Stoffwechsels der Leberepithelzelle während der
experimentellen Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin.

Beitr. Path. Anat. 128, 376-415 (1963).

- 31) Okamura N., Busch H.

Base Composition on High Molecular Weight Nuclear
RNA of Walker Tumor and Liver of the Rat.

Cancer Res. 25, (1965).

- 32) Schauer A.

Histochemische Untersuchungen über Nucleosid-5' -
Triphosphat-spaltende Kernenzyme an Mastocytomzellen
und normalen Mastzellen.

Verh. dtsch. Ges. Path. 47. Tagung 1963.

33) Schauer A.

Histochemische und biochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin an der Rattenleber.

34) Schmähel D., Preußmann R., Hamperl H.

Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin (DÄNA) nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89 (1960).

35) Siebert G., Villalobos J., Ro T.S., Steele W.J., Lindenmayer

G., Adams H., Busch H.
Enzymatic studies on isolated nucleoli of rat liver.
J. Biol. Chem., Vol. 241, 1 71-78 (1966).

36) Villalobos J., Steele W.J., Busch H.

Ribonuclease activity of isolated nucleoli of livers of thioacetamide-treated rats.
Biochem. biophys. Acta 103, 195-200 (1965).

37) Vorbrodt A.

Electron microscopic studies on the localization of guanosine-5'-triphosphatase A activity in cell nuclei.
Acta histochem. 28, 215-226 (1967).

Herrn Prof. Dr. A. Schauer danke ich für die Überlassung des
Themas, für seine Anleitung und für seine freundliche Unter-
stützung.

Herrn Prof. Dr. F. Miller danke ich für die Anfertigung der
elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der
Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Lebenslauf.

Am 10. August 1945 bin ich als erstes Kind des Ministerialrates Wilhelm Vocke und seiner Ehefrau Karolina, geb. Rixner, in Augsburg geboren.

Nach vierjährigem Volksschulbesuch trat ich im Herbst 1955 in das neusprachliche Gymnasium des A.B. von Stetten'schen Institutes in Augsburg ein und bestand dort nach neunjährigem Besuch im Juni 1964 das Abitur.

Im November 1964 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dort legte ich am 28. Oktober 1965 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 28. Februar 1967 die ärztliche Vorprüfung ab. Die ersten drei klinischen Semester studierte ich ebenfalls in München. Danach setzte ich, nach meiner Verheiratung, im WS 1968/69 mein Studium an der Johann-Wolfgang-v. Goethe-Universität in Frankfurt/Main fort. Am 3. März 1970 begann ich an dieser Universität mit dem Staatsexamen.



gesamtherstellung.
ditters bürodienst
mainz
1970